

DISS. ETH Nr. 19666

**Two-photon imaging of neural activity and structural plasticity  
in the rodent spinal cord**

Abhandlung zur Erlangung des Titels

DOKTOR DER WISSENSCHAFTEN

der

ETH ZÜRICH

vorgelegt von

HELGE CHRISTIAN JOHANNSEN

Dipl. hum.biol., Philipps-Universität Marburg

geboren am 4. Januar 1980

von

Deutschland

Angenommen auf Antrag von

Professor Martin Schwab  
Professor Fritjof Helmchen  
Professor Hanns Ulrich Zeilhofer

2011

## Summary

In my PhD thesis, I used two-photon imaging to investigate neuronal circuits and glia cells in the spinal cord of living mice. To achieve this, a major effort first was to establish a mouse spinal cord preparation suitable for stable and long-lasting imaging experiments. Without adequate stabilisation, the spinal cord was prone to large-scale movement artefacts clearly hampering high-resolution imaging *in vivo*. To overcome these limitations, I employed strategies to optimise the animals posture, namely rigid clamping of the vertebral column to isolate the spinal cord from breathing-related movements. In addition, I developed strategies to dampen tissue movements remaining after posture optimisation. These improvements made it possible to image the structural plasticity of genetically labelled microglia cells with subcellular resolution for many hours in anesthetized mice. In a paradigm of focal spinal cord injury, microglia became rapidly activated and displayed high levels of filopodial motility clearly directed towards the injury site. In addition, I adapted  $\text{Ca}^{2+}$  indicator loading techniques to stain neuronal networks in the mouse superficial dorsal horn to visualize activity patterns of pain-processing neurons. Despite the heavily myelinated surrounding tissue, neuronal populations within the first two laminae could be visualized after  $\text{Ca}^{2+}$  indicator loading. The preparation was sufficiently stable to for the first time resolve fast, individual  $\text{Ca}^{2+}$  transients in the spinal cord of living rodents. In agreement with the role of dorsal horn circuits in nociceptive processing I found low rates of spontaneous activity but could reliably evoke increased activity levels by electrical stimulation of primary afferent fibres *in situ*. Specifically, also natural sensory stimulation applied to the paw elicited  $\text{Ca}^{2+}$  transients in a subset of dorsal horn neurons.

In a parallel project, I collaborated with Klas Kullander's group to investigate activity patterns of identified Renshaw cells during an *in vitro* model of locomotion. Using two-photon  $\text{Ca}^{2+}$  imaging in the isolated neonatal mouse SC, we found that several subclasses of Renshaw cells are differentially engaged in ongoing locomotion. In addition, the activities of the different Renshaw cell

populations were correlated with subgroups of simultaneously recorded motoneurons. Afferent inputs delivered during ongoing locomotion perturbed the locomotor rhythm and the nature of perturbations depended on stimulus timing during either the flexor- or extensor-related cycle phase. On the local circuit level, we observed that correlations between specific Renshaw cells and motoneuron subpopulations were boosted by sensory input and that this effect also depended on stimulus timing. In a broader context, these results can be interpreted as reflections of synaptic strengthening of developing locomotor modules by sensory inputs.

## Zusammenfassung

In meiner Doktorarbeit habe ich neuronale Netzwerke sowie Gliazellen im Rückenmark lebender Mäuse mit Hilfe der 2-Photonen-Mikroskopie untersucht. Da das Rückenmark ohne geeignete Stabilisierungsmassnahmen hohe Bewegungsartefakte aufwies, musste ich zunächst das Ausmaß dieser störenden Bewegungen reduzieren um hochauflösende Messungen unter stabilen Bedingungen durchführen zu können. Die Stabilisierung der Wirbelsäule erwies sich als adäquates Mittel, um das Rückenmark mechanisch von den regelmäßig auftretenden Atembewegungen zu entkoppeln und die Körperstellung des Tieres zu optimieren. Zusätzlich konnte ich durch weitere Dämpfungsmassnahmen auch die verbleibenden oszillatorischen Bewegungen des Rückenmarks minimieren. In der derart stabilisierten Rückenmarkspräparation konnte ich im anästhesierten Tier die strukturelle Plastizität genetisch angefärbter Microgliazellen mit subzellulärer Auflösung über viele Stunden hin unter dem 2-Photonen-Mikroskop verfolgen. Infolge einer experimentell induzierten Mikroläsion des Rückenmarks wurden die umgebenden Mikrogliazellen innerhalb von kürzester Zeit aktiviert und bildeten zahlreiche Fortsätze in Richtung der Verletzung aus. Des Weiteren habe ich bestehende  $\text{Ca}^{2+}$  Indikatorfärbungen modifiziert, um schmerzverarbeitende Nervenzellgruppen im Hinterhorn von Mäusen anfärben und deren Aktivitätsmuster aufnehmen zu können. Trotz des stark vorhandenen Myelins konnten nach der Färbung Neuronen innerhalb der ersten beiden Rückenmarksschichten beobachtet werden. Die Präparation erwies sich zudem als stabil genug um erstmalig im lebenden Nager einzelne  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten aufzulösen. Im Einklang mit der Rolle des Hinterhorns für die Schmerzverarbeitung habe ich nur geringe Spontanaktivität beobachtet. Elektrische Reizung primärafferenter Faserbündel löste jedoch in vielen Zellen deutliche Aktivität aus. Zudem konnte ich auch nach mechanischer Reizung der Pfote in einigen Zellen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten beobachten.

Parallel zu diesen Projekten, habe ich im Rahmen einer Kollaboration mit Klas Kullanders Labor die Aktivitätsmuster identifizierter Renshawzellen *in vitro*

während experimentell induzierter Bewegung untersucht. Mit Hilfe von optischen  $\text{Ca}^{2+}$  Messungen unter dem 2-Photonen-Mikroskop konnten mehrere Subtypen von Renshawzellen identifiziert werden, die unterschiedliches Verhalten während der fiktiven Bewegung zeigten. Außerdem waren die Aktivitäten verschiedener Gruppen von Renshawzellen und Motoneuronen differentiell miteinander korreliert. In Abhängigkeit des Stimulationszeitpunktes wurde der Bewegungsablauf durch sensorische Reizung auf unterschiedliche Weise gestört. Interessanterweise zeigten korrelierte Subgruppen von Renshawzellen und Motoneuronen nach der Stimulation sensorischer Afferenzen eine nochmals höhere Korrelation, was als sensorisches Lernsignal innerhalb eines sich entwickelnden Bewegungsmoduls gedeutet werden kann.